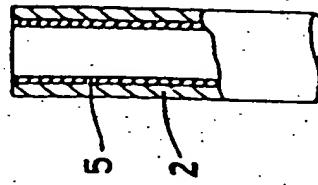


EN 9-97

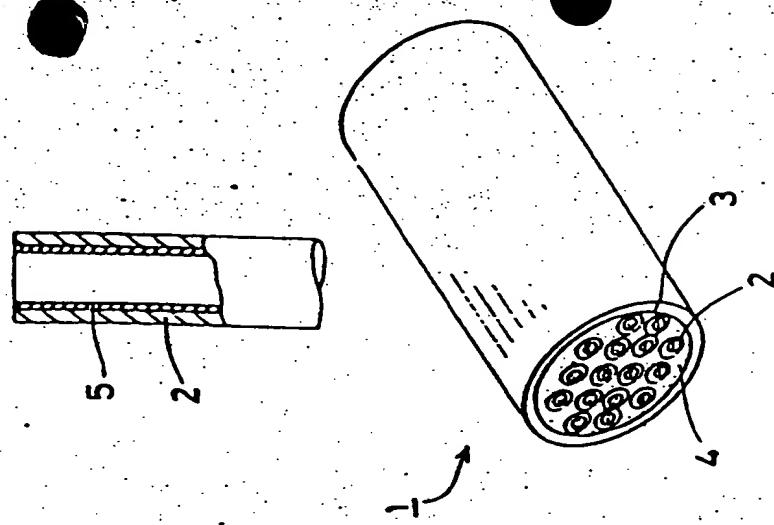
## (54) BIOREACTOR ELEMENT

(11) 61-100186 (A) (43) 19.5.1986 (19) JP  
 (21) Appl. No. 59-222834 (22) 22.10.1984  
 (71) SHIMADZU CORP (72) SHOTARO OKA  
 (51) Int. Cl'. C12M1/40



**PURPOSE:** To provide a bioreactor for synthetic or diagnostic use, having high enzymatic reaction efficiency and low pressure load, and composed of a supporting member to collect and fix a number of capillary spaces in a bundle, and thin films of immobilized enzyme covering the inner wall surface of the capillary spaces.

**CONSTITUTION:** A number of glass capillaries 2 are inserted into a glass tube 3 in the form of a bundle, and fixed by pouring an adhesive 4 such as epoxy resin between the capillaries 2 to obtain a support having a number of capillary spaces. A coating film is applied to the inner wall of each glass capillary 2 by introducing a metal alkoxide solution composed of  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ , cellulose, ethanol, etc. to the capillary, and amino group is introduced to the inner wall by reacting with  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane. The objective bioreactor 1 is produced by fixing an enzyme to the inner wall by the use of glutaraldehyde, etc., thereby forming a thin immobilized enzyme film 5.



## LEGENDE

## zu den Bibliographiedaten

## (54) Titel der Patentanmeldung

(11) Nummer der JP-A2 Veröffentlichung

(21) Aktenzeichen der JP-Anmeldung

(43) Veröffentlichungstag

## (22) Anmeldetag in Japan

(71) Anmelder (72) Erfinder

(52) Japanische Patentklassifikation

(51) Internationale Patentklassifikation

BEST AVAILABLE COPY

(R)

⑤ Int.Cl.  
C 12 M 1/40識別記号 厅内整理番号  
8412-4B

④公開 昭和61年(1986)5月19日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑤発明の名称 バイオリアクター素子

⑥特願 昭59-222834

⑦出願人 株式会社島津製作所

⑧発明者 岡正太郎 京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三条工場内

⑨代理人 弁理士 野河信太郎 京都市中京区河原町通二条下ル一ノ船入町378番地

## 明細書

## 1. 発明の名称

バイオリアクター素子

## 2. 特許請求の範囲

(1) 多数の細管状空隙を束状に集合設定する支持体と、該支持体の各々の細管状空隙を構成する内壁面に被覆形成された薄膜状固定化酵素、とから構成されてなるバイオリアクター素子。

## 3. 発明の詳細な説明

## (1) 産業上の利用分野

この発明は、バイオリアクター素子に関する。さらに詳しくは、種々のバイオリアクター、ことに固定化酵素を用いた合成用や診断用のバイオリアクターとして有用なバイオリアクター素子に関する。

## 4. 従来技術

最近、合成用や診断用のバイオリアクターとして固定化酵素を用いたものが用いられるようになつてきた。これらの固定化酵素を用いたバイオリアクター素子としては、ピーズ状のガラス等の球

体の表面に酵素を固定化しこれを円筒状カラムに充填しその充填空隙を利用して試料や原料を通過させるように構成したものや、織布の表面に酵素を固定化しこれを横層しこの織布目の間隙に試料や原料を通過させるよう構成したものが代表的である。

しかしながら、これらのバイオリアクター素子において酵素反応の効率を高めるためには、ピーズ径を小さくしたり織布目を小さくしてできるだけ空隙や間隙を小さくすることを要するが、この場合、通過する試料や原料の圧損が大きくなりバイオリアクターとしての運転が困難となつたり、酵素を固定化した支持体の破損を招く場合が生じたり、目詰りが生じる等の問題点があつた。ことに、これらの問題点は、粘性の高い液体(例えば、タルコース溶液、等)や、圓形粉末、コロイド状物質(例えば、鐵粉、等)を含む液体を対象とする際に著しく、これらの液体の使用時にも圧損が低くかつ高い酵素反応効率を発現しうるバイオリアクター素子が望まれている。

BEST AVAILABLE COPY

## 〔1〕発明の属する技術

この発明は、固定化酵素に焦点をなされたものであり、酵素反応効率が高くかつ圧力負荷の減少されたバイオリアクターを提供しようとするものである。

## 〔2〕発明の構成

かくしてこの発明によれば、多数の細管状空隙を束状に集合設定する支持体と、該支持体の各々の細管状空隙を構成する内壁面に被覆形成された薄膜状固定化酵素、とから構成されてなるバイオリアクター粒子が提供される。

この発明は、要するに、バイオリアクター粒子の流路を従来のような粒子充填空隙や織布横層間隙ではなく、多数の細管状空隙で構成し、それにより高い酵素反応効率を維持しつつ使用時の圧損の低減化を可能としたものである。そしてかような細管状空隙内への固定化酵素膜の形成を実現した点にも一つの特徴を有するものである。

この発明の支持体における細管状空隙の断面形状は円形に限らず角状、梢円状等のいずれであつ

てもよい。かかる細管状空隙の断面積は約0.04～2.0mm<sup>2</sup>が適しており約0.08～1.0mm<sup>2</sup>が好ましい。また設定されるこれら細管状空隙の数は処理量に左右されるが、実用上、少なくとも100本以上が適しており、1000～10000本が好ましい。

上記細管状空隙を備えた支持体は、多数の細管を束状に接着剤等で接合するか又はブロック状の支持体原料に直接多数の細管状空隙を穿つことにより構成することができる。これら支持体の材質としては、プラスチック、金属、ガラス、セラミック等の種々のものを適用することができるが、後述する固定化酵素膜の密着性等の点で、ガラス又はセラミックを適用するのが好ましい。なお、バイオリアクター粒子自体の機械的強度及び作製上の容易さ等の点で断面六角形のガラス細管を束状に接着一体化したヘニカム状の支持体を用いるのが好ましい。

上記支持体の細管状空隙を構成する内壁面に形成させる固定化酵素膜は薄膜でありかつ高活性で

あることを要する。かかる固定化酵素膜は、金属アルコキシドや酵素を配位子とする有機金属キレート化合物を溶解した易揮発性の親水性溶媒溶液（例えば、メタノール、エタノール等の低級アルコール溶液）に膜を懸滴し、この液を上記支持体の多数の細管状空隙内に導入し減圧により密着させて各内壁面に液膜を付着させ、次いでこれを放置し加水分解及び乾燥を行なつて金属水酸化物系のゲル膜に変換し、このゲル膜を担体として酵素を固定化することにより形成することができる。

上記担体の原料となる金属アルコキシドとしては、 $Si(OCH_3)_4$ 、 $Si(OC_2H_5)_4$ 、 $Ti(OC_2H_5)_4$ 、 $V(OC_2H_5)_3$ 、 $Al(OC_2H_5)_3$ 、 $Co(OC_2H_5)_3$ 、 $Ni(OC_2H_5)_3$ 、 $Fe(OC_2H_5)_3$ 等が挙げられ、これらのうち低級アルコキシランが好ましい。また、酵素を配位子とする有機金属キレート化合物としては、アルカンジオン又はその誘導体の金属キレート化合物が適しており、例えば、2,4-ベンタジオン（アセチルアセトン）、3-フェニル-2,4-ベンタジオン（3-フェニルア

セテルアセトン）、2,4-ヘキサンジオン、2,4（又は3,5）-ヘプタンジオン、2,2,6,6-テトラメチル-3,5-ヘプタンジオン（ジビペロイルメタン）等の低級アルカンジオン類のカルシウム、アルミニウム、チタン、亜鉛、鉄又はカリウムキレート化合物が挙げられる。これら金属アルコキシドや有機金属キレート化合物はもちろん混合して用いてよい。

また、上記親水性溶媒溶液中に添加する膜としては種々の鉱膜が挙げられるが、フッ化水素酸を用いるのが好ましく、塩酸でpH 1～3とした後フッ化水素酸を少量添加するのが最も好ましい。フッ化水素酸の添加量は金属に対するモル比として0.5～1.0モル程度が適切である。なお、この溶液中には少量の水が添加されていてよい。

このようにして得られる金属水酸化物系のゲル体は薄膜（通常0.5μm～0.2μm）でありかつ多孔性のものであり、しかも全体に多数の水酸基を有したものである。

このような薄膜担体への酵素の固定化自体は、

シランカップリング剤を用いた方法や臭化シアン活性化法等の公知の方法を適用することができ、最も好ましい方法は、液圧吸引により、アーミノプロピルトリエトキシシランの溶液を上記粗体が被覆された支持体の細管状空隙内に導入して保持し、この後グルタルアルデヒドを同様にして保持させ、最後に所望の酵素溶液を保持させる方法である。

第1図及び第2図にこの発明のバイオリアクター素子をそれぞれ示した。第1図は、ガラス細管(2)をガラス外被(3)中に束状に挿入し各細管の間に接着剤(4)を充填し固定して支持体とし、この各ガラス細管(2)の内壁面に薄膜状の固定化酵素膜(5)を被覆形成して構成した円筒状のバイオリアクター素子(1)を示すものである。一方、第2図は、断面六角形の細管(2')を束状に接着剤で接着一体化し、この各細管(2')の内壁面に薄膜状の固定化酵素膜(5)を被覆形成して構成したハニカム状のバイオリアクター素子(1')を示すものである。

#### 4 実施例

端にアルデヒド基を有するシッフベースを導入した。

上記処理を行なつた後、細管状空隙内に、10%のグルコースオキシダーゼ(pH 7.0 リン酸塩緩衝液)溶液を注入することによりカップリング剤残基を介して化学結合によりグルコースオキシダーゼを固定化を行ない、乾燥することにより第1図に示すとおりこの発明のバイオリアクター素子(1)を得た。

このようにして得られたバイオリアクター素子を用い、グルコースをD-グルコノラクトンと過酸化水素に分解し、グルコースの減少をグルコース計により定量することによりバイオリアクターとしての活性を評価したところ、従来のビーズ状アルコキシドガラス上に固定化したものと同様な活性が認められ、しかも圧損が低く流速を高めることができることで酵素反応効率に優れたものであることが判つた。

#### 5 発明の効果

以上述べたごとく、この発明のバイオリアクタ

内径2mm、長さ20cm、肉厚1mmのガラス細管を内径10mmのガラス外被内に多数挿入しこの内部にエポキシ系接着剤を注入して多数の細管状空隙を有する支持体を作製した。次いでこの細管状空隙の中に、他端から液圧法により  $Si(OCH_3)_4$ 、  $H_2O$ 、  $HC_2$ 、セルロース及び  $C_2H_5OH$  からなる金属アルコキシド溶液を注入し不要な溶液を吸引除去することにより、各空隙の内壁面に該溶液の薄膜を付着させた。この後、この支持体を100℃下30分間の条件下放置することによつて金属アルコキシドの加水分解及び溶媒等の蒸発を餘々に進行せることにより、膜厚約0.1mmの金属水酸化物を主体とするグル膜を形成させた。

次いでこの細管状空隙の内に液圧法によつて、5wt%のアーミノプロピルトリエトキシシランのpH 3.5緩衝水溶液を注入し85℃下、2時間保持して、前記グル膜中に水酸基を介してこのカップリング剤を結合導入し、さらに25wt%の二官能性のグルタルアルデヒドのpH 7.0緩衝水溶液を注入し1時間保持してカップリング剤の末

一素子は、圧力負荷が小さくかつ酵素反応効率が高いものであり、ことに従来通用が困難であつた高粘度液体、不純物含有液体等のバイオリアクターとして有用なものである。

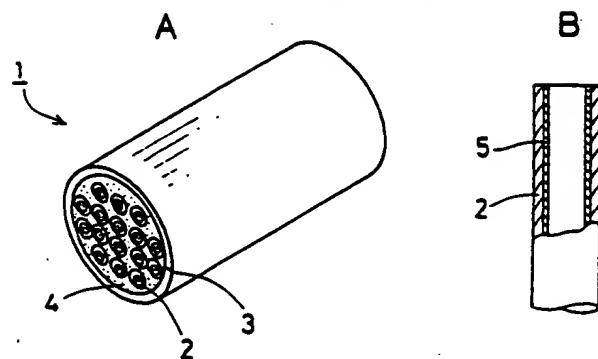
#### 6 図面の簡単な説明

第1図Aはこの発明のバイオリアクター素子の一実施例を示す斜視図、第1図Bは同実施例中の支持体の一部を構成する細管を示す部分断面図、第2図Aはこの発明のバイオリアクター素子の他の実施例を示す斜視図、第2図Bは、同実施例の支持体の一部を構成する細管を示す部分断面図である。

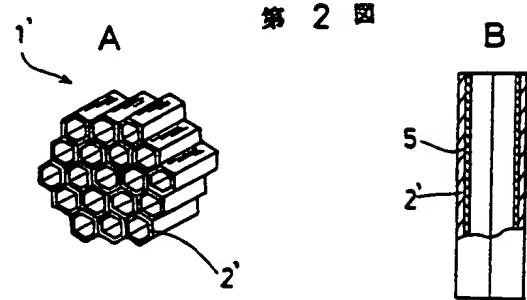
(1) (1') .....バイオリアクター素子、(2) (2') .....細管、(3) .....ガラス外被、(4) .....接着剤、(5) .....固定化酵素膜。

代理人弁護士野河信太郎

第1図



第2図



BEST AVAILABLE COPY